

L

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
4 juillet 2002 (04.07.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 02/051871 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C07K 16/28**

F-44100 Nantes (FR). **LAFLAMME, Geneviève** [FR/FR];  
141, rue d'Allonville, Appt. 9, F-44000 NANTES (FR).  
**VANHOVE, Bernard** [FR/FR]; 72 bis, rue Henri Barbusse, F-44400 REZE (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :  
**PCT/FR01/04203**

(74) Mandataires : **ORES, Béatrice** etc.; CABINET ORES, 6,  
avenue de Messine, F-75008 PARIS (FR).

(22) Date de dépôt international :  
26 décembre 2001 (26.12.2001)

(81) États désignés (*national*) : JP, US.

(25) Langue de dépôt :  
français

(84) États désignés (*régional*) : brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, TR).

(30) Données relatives à la priorité :  
00/17025 26 décembre 2000 (26.12.2000) FR

Publiée :

- sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport
- avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)** [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 PARIS (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **SOULILLOU, Jean-Paul** [FR/FR]; 32 ter, rue de l'Abbaye,



A2

**WO 02/051871**

(54) Title: ANTI-CD28 ANTIBODY

(54) Titre : ANTICORPS ANTI-CD28

(57) Abstract: The invention concerns an antibody directed against the CD28 receptor and capable of blocking CD28/B7 interaction, and proteins derived from said antibody, for use in particular to block CD28-dependent activation of lymphocytes.

(57) Abrégé : Anticorps dirigé contre le récepteur CD28, et capable de bloquer l'interaction CD28/B7, et protéines dérivées de cet anticorps, utilisables notamment pour bloquer l'activation CD28-dépendante des lymphocytes.

## ANTICORPS ANTI-CD28

L'invention est relative à des anticorps dirigés contre le récepteur lymphocytaire CD28 et à leurs fragments, et à leurs utilisations thérapeutiques, notamment dans le 5 cadre de la régulation de l'activation des cellules T.

Une activation anormale des cellules T intervient dans la pathogenèse de nombreuses maladies autoimmunes, ainsi que dans les phénomènes de rejet de greffes où elle provoque le développement d'une réponse immunitaire dirigée contre le 10 greffon.

L'activation des lymphocytes T nécessite un signal activateur, induit par la reconnaissance par les récepteurs T (TCR) de l'antigène associé avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et présenté 15 par les cellules présentatrices de l'antigène (CPAg). Cette activation n'entraîne cependant la prolifération des cellules T et la sécrétion de cytokines immunomodulatrices spécifiques (telles que l'interleukine 2, l'interféron gamma ou l'interleukine 4), que si d'autres systèmes de co-stimulation 20 T sont également activés.

L'un des systèmes les plus importants de régulation de l'activation des lymphocytes T est le système moléculaire B7/CD28/CTLA4. Ce système joue par exemple un rôle essentiel dans les mécanismes du rejet de greffe 25 [WOODWARD et al., Transplantation, 66, 14-20, (1998)]. Les molécules B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) portées par les CPAGs peuvent activer le récepteur CD28 ainsi que le récepteur CTLA4 des lymphocytes T. L'activation du CD28 délivre au lymphocyte T un signal positif stimulant la cellule ; en revanche, l'activation du CTLA4 délivre un signal négatif conduisant à une non-réponse (anergie) [FALLARINO et al., 30 J. Exp. Med., 188, 205-210, (1998)].

Les lymphocytes T au repos expriment une quantité importante de CD28, et très peu de CTLA4. Lors d'un premier 35 contact cognitif entre une CPAG et un lymphocyte T, l'interaction CD28/B7 est privilégiée, ce qui active la cellule. Ce n'est que plusieurs heures après l'initiation de l'activation, du fait de l'augmentation de l'expression

membranaire de CTLA4 dont l'affinité pour B7 est 5 à 10 fois supérieure à celle du CD28, que l'interaction B7/CD28 se déplace au profit d'une interaction B7/CTLA4.

Actuellement, pour bloquer l'activation des lymphocytes T, notamment dans le cadre des transplantations d'organes, on utilise principalement la cyclosporine. Malgré l'efficacité de ce médicament, la protection qu'il confère n'est cependant pas absolue. En outre, il agit en bloquant toutes les voies d'activation cellulaires dépendantes du calcium, et possède donc une activité biologique qui n'est pas strictement spécifique de lymphocytes T et entraîne un nombre important d'effets secondaires. Il est donc souhaitable de développer de nouveaux immunosuppresseurs au mode d'action défini et de spécificité plus grande.

Il a été postulé que l'inhibition sélective du signal agoniste délivré à la cellule T par le CD28 en laissant intact le système antagoniste constitué par le couple CTLA4/B7, par l'intermédiaire d'un blocage spécifique de l'interaction CD28/B7 permettrait de prévenir l'activation des lymphocytes T. Un tel blocage spécifique de l'interaction CD28/B7 peut être obtenu à l'aide d'un anticorps dirigé contre CD28.

Des anticorps anti-CD28 capables d'empêcher la liaison de CD28 avec B7 sont connus. Ils présentent toutefois l'inconvénient, lorsqu'ils sont utilisés sous leur forme native divalente, d'entrainer la dimérisation et l'activation de CD28 par leur liaison avec ce récepteur. Cependant, des fragments monovalents issus de ces anticorps sont capables de bloquer sans l'activer le récepteur CD28 [DAMLE et al., J. Immunol., 140, 1753-1761, (1988); NUNES et al., Int. Immunol., 5, 311-315, (1993) ; PAGES et al., J. Biol. Chem., 271, 9403, (1996)].

Il a ainsi été rapporté [PERRIN et al., J. Immunol. 163, 1704-1710, (1999)] que des fragments Fab issus d'un anticorps anti-CD28 pouvaient enrayer les symptômes cliniques de l'encéphalite expérimentale auto-immune induite chez la souris par l'administration de myéline ou le transfert de cellules T d'un animal atteint.

Des fragments monovalents, Fab ou scFv, dérivés d'un anticorps anti-CD28 sont potentiellement utilisables pour prévenir l'activation des lymphocytes T par l'intermédiaire d'un blocage spécifique de l'interaction CD28/B7.

Les fragments Fab résultent de l'action de la papaine sur une molécule d'immunoglobuline, et contiennent chacun une chaîne légère et la première moitié d'une chaîne lourde ; les fragments scFv sont constitués des portions variables des chaînes lourdes et légères d'un anticorps, reliées entre elles par l'intermédiaire d'un lieu flexible [CLACKSON et al., Nature, 352, 624-628, (1991)], formant ainsi une protéine simple-chaîne.

Ces fragments monovalents présentent fréquemment une affinité pour l'antigène moins importante que celle des anticorps natifs, ce qui peut limiter leurs possibilités d'utilisation dans des applications diagnostiques ou thérapeutiques.

Les Inventeurs sont parvenus à sélectionner, parmi différents anticorps reconnaissant l'antigène CD28, un anticorps capable de bloquer l'interaction CD28/B7, et dont les fragments monovalents présentent une affinité pour l'antigène suffisante pour être utilisables, *in vitro* ou *in vivo*, pour bloquer le récepteur CD28 sans activation de ce récepteur.

Cet anticorps, dénommé CD28.3, est produit par l'hybridome déposé, selon les termes du traité de Budapest, le 28 novembre 2000 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15) sous le numéro I-2582.

La présente invention a pour objet une protéine capable de se lier spécifiquement au récepteur lymphocytaire CD28 et de bloquer l'interaction CD28/B7, caractérisé en ce qu'elle comprend au moins les CDRs de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'immunoglobuline CD28.3.

Les CDRs (régions déterminant la complémentarité) sont les portions des régions variables d'une immunoglobuline

impliquées dans la spécificité de reconnaissance de l'antigène.

Des protéines conformes à l'invention englobent ainsi notamment :

5 a) l'anticorps CD28.3 produit par l'hybridome CNCM I-2582 ;

b) les fragments Fv, Fab, Fab'2 ou scFv de l'anticorps CD28.3 ;

10 c) les anticorps chimériques ou humanisés obtenus à partir des régions variables de CD28.3 ;

d) les fragments des anticorps b) ci-dessus comprenant les CDRs de l'anticorps CD28.3, qu'il s'agisse de fragments monovalents, Fv, Fab, ou scFv, ou de fragments divalents Fab'2 ;

15 e) les protéines recombinantes comprenant un fragment b) ou d) et un polypeptide hétérologue.

Il peut s'agir par exemple :

- de dérivés di- ou plurivalents de fragments scFv, tels que les « diabodies » ou « triabodies », résultant 20 de l'association de 2 ou 3 fragments scFv;

- de protéines associant au moins un fragment d'anticorps comprenant les CDRs de l'anticorps CD28.3, avec au moins un fragment d'anticorps comprenant les CDRs d'un anticorps de spécificité différente ; on citera à titre 25 d'exemples, des immunoglobulines bi-spécifiques, des conjugués d'un fragment Fv ou Fab contenant les CDRs de CD28.3 avec un fragment Fv ou Fab d'un anticorps de spécificité différente, des « diabodies bi-spécifiques » résultant de l'association d'un fragment scFv contenant les 30 CDRs de CD28.3 avec un fragment Fv ou Fab d'un anticorps de spécificité différente.

- de protéines associant au moins un fragment d'anticorps comprenant les CDRs de l'anticorps CD28.3, avec une molécule dotée d'activité pharmacologique (par exemple une toxine), ou de propriétés effectrices (par exemple un fragment Fc).

- de protéines associant au moins un fragment d'anticorps comprenant les CDRs de l'anticorps CD28.3, avec

une molécule permettant de prolonger sa demi-vie plasmatique lors de son administration *in vivo*; on peut par exemple associer ledit fragment d'anticorps avec un polypeptide hydrosoluble de masse moléculaire suffisante pour que la 5 masse moléculaire du polypeptide de fusion ainsi obtenu soit supérieure au seuil de filtration rénale. Dans ce cas, on choisira un polypeptide qui contrairement aux fragments Fc, ne puisse pas s'associer en dimères, et qui ne possède pas d'activité effectrice propre susceptible d'entraîner des 10 effets secondaires inopportuns. Des polypeptides possédant ces propriétés peuvent avantageusement être obtenus à partir de protéines sériques hydrosolubles, à savoir notamment l'albumine sérique, l'haptoglobuline, l'ITIH2 (inhibiteur inter-alpha (globuline), polypeptide H2), la transferrine, le 15 CBG (protéine liant les corticostéroïdes), l'α1 antitrypsine, l'ITIH4 (inhibiteur inter-alpha (globuline), polypeptide H4), l'AACT (alpha-1-antichymotrypsine), le TBG (globuline liant la thyroxine), le fibrinogène et la prothrombine, pour préparer des protéines de fusion avec des 20 fragments scFv dérivés d'anticorps anti-CD28. On peut également conjuguer une protéine conforme à l'invention avec un polyol, par exemple le polyéthylène glycol, comme décrit par exemple dans le Brevet US 4,179,337.

Un exemple d'une protéine conforme à l'invention 25 est illustré par la Figure 1, qui représente un fragment scFv dérivé de l'anticorps CD28.3. Les séquences des CDRs de l'anticorps CD28.3 sont encadrées dans la séquence représentée sur la Figure 1.

La séquence nucléotidique codant pour ce fragment 30 scFv est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1 et la séquence peptidique correspondante est représentée sous le numéro SEQ ID NO: 2.

Des fragments Fv, Fab, ou Fab'2 conformes à 35 l'invention peuvent être obtenus par les techniques classiques de digestion enzymatique, à partir de l'anticorps CD28.3.

Un plasmide contenant un polynucléotide codant pour un fragment scFv de CD 28.3, fusionné à un

polynucléotide codant pour les acides aminés 53 à 425 de l'α1 antitrypsine a été déposé, selon les termes du traité de Budapest, le 11 décembre 2001 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes, 25 rue 5 du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15), sous le numéro I-2762.

Des protéines conformes à l'invention telles que des anticorps chimériques ou recombinants, des fragments scFv et leurs dérivés, etc. peuvent être obtenues, par les 10 techniques classiques du génie génétique, telles que celles décrites par SAMBROOK et al., [MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989)].

Des polynucléotides codant les régions variables 15 de l'anticorps anti-CD28.3 peuvent par exemple être obtenus par clonage desdites régions variables à partir d'une banque d'ADNc de l'hybridome CD28.3, ou à partir du plasmide CNCM I-2762. Ils peuvent également être préparés totalement ou partiellement, par synthèse d'acides nucléiques, à partir des 20 séquences nucléotidiques desdites régions variables. On peut par exemple synthétiser des polynucléotides codant les CDRs de CD28.3, et les incorporer dans les régions de charpente (FR pour « framework regions ») d'un autre anticorps, notamment d'un anticorps d'origine humaine, par les 25 techniques, connues en elles-mêmes, de greffe de CDRs, telles que celles décrites par ROUTLEDGE et al., ["Reshaping antibodies for therapy", in PROTEIN ENGINEERING OF ANTIBODY MOLECULES FOR PROPHYLATIC AND THERAPEUTIC APPLICATIONS IN MAN, 13-44, Academic Titles, Nottingham, England (1993)] ou 30 par ROGUSKA et al., Protein Engineering, 9(10), 895-904, (1996)].

La présente invention a également pour objet toute molécule d'acide nucléique codant une protéine conforme à l'invention comprenant les CDRs de l'anticorps CD28.3, 35 ainsi que tout vecteur recombinant, notamment tout vecteur d'expression, comprenant ladite molécule d'acide nucléique.

La présente invention a également pour objet toute cellule exprimant une protéine conforme à l'invention

comportant les CDRs de l'anticorps CD28.3. Ceci englobe notamment l'hybridome CNCM I-2582, ainsi que les cellules-hôtes transformées par une molécule d'acide nucléique conforme à l'invention.

5 Des molécules d'acide nucléique conformes à l'invention peuvent avantageusement comprendre, outre une séquence codant une protéine conforme à l'invention, une séquence codant un peptide signal permettant la sécrétion de ladite protéine ; elles peuvent aussi comprendre une ou 10 plusieurs séquence(s) codant un ou plusieurs peptide(s) marqueur(s) permettant la détection et/ou facilitant la purification de ladite protéine.

Des vecteurs d'expression conformes à l'invention comprennent au moins une séquence d'acide nucléique codant 15 une protéine conforme à l'invention, associée à des éléments de contrôle de la transcription et de la traduction actifs dans la cellule-hôte choisie. Des vecteurs utilisables pour la construction de vecteurs d'expression conformes à l'invention sont connus en eux-mêmes, et seront choisis 20 notamment en fonction de la cellule-hôte que l'on souhaite utiliser.

Des cellules-hôtes utilisables dans le cadre de la présente invention peuvent être des cellules procaryotes ou eucaryotes. Parmi les cellules eucaryotes utilisables, on 25 citera en particulier des cellules végétales, des cellules de levure, telles que *Saccharomyces*, des cellules d'insecte, telles que les cellules de *Drosophila*, ou de *Spodoptera* et des cellules de mammifères telles que les cellules HeLa, CHO, 3T3, C127, BHK, COS, etc...

30 La construction de vecteurs d'expression conformes à l'invention, et la transformation des cellules-hôtes peut être effectuée par les techniques classiques de biologie moléculaire.

35 L'invention a également pour objet un procédé de production d'une protéine conforme à l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend la mise en culture d'au moins une cellule conforme à l'invention, et la récupération de ladite protéine à partir de ladite culture.

Si la protéine est sécrétée, elle peut être récupérée directement à partir du milieu de culture ; sinon on procédera préalablement à la lyse des cellules.

La protéine peut ensuite être purifiée à partir 5 du milieu de culture ou du lysat cellulaire, par des procédures classiques, connues en elles-mêmes de l'homme de l'art, par exemple par précipitation fractionnée, notamment précipitation au sulfate d'ammonium, électrophorèse, filtration sur gel, chromatographie d'affinité, etc.

10 Les protéines conformes à l'invention peuvent être utilisées *in vitro* pour étudier la réponse proliférative ou la différentiation de lymphocytes T répondant à une stimulation antigénique, virale, allogénique ou xénogénique. Elle peut être également utilisée *in vitro* pour induire la 15 différenciation de lymphocytes T prélevés chez un patient, par exemple l'induction d'une tolérance vis-à-vis d'un antigène ou d'un alloantigène, destinés à être par la suite ré-administrés *in vivo*.

Elles peuvent également être utilisées pour 20 l'obtention de médicaments, ou de réactifs de diagnostics.

Des protéines conformes à l'invention, divalentes, c'est à dire possédant 2 sites de liaison au récepteur CD28, et donc capables d'induire la dimérisation de ce récepteur, sont utilisables dans tous les cas où l'on 25 souhaite activer ce récepteur CD28, c'est-à-dire augmenter la réponse d'un lymphocyte T vis à vis d'un antigène.

Des protéines conformes à l'invention, monovalentes, c'est à dire possédant un seul site de liaison au récepteur CD28, sont utilisables dans tous les cas où l'on 30 souhaite bloquer sélectivement ce récepteur sans l'activer, afin d'induire une immunosuppression.

Une protéine conforme à l'invention, comprenant un fragment monovalent dérivé d'un anticorps anti-CD28 peut notamment être utilisée pour l'obtention d'un médicament 35 immunsupresseur, bloquant sélectivement les phénomènes d'activation des cellules T impliquant le récepteur CD28, et ne présentant pas les inconvénients des immunsupresseurs connus, tels que la cyclosporine.

L'immunosuppression T par blocage sélectif du CD28 par une protéine conforme à l'invention possède des applications dans toutes les pathologies dépendantes des lymphocytes T.

Il s'agit essentiellement du rejet de greffe, de la maladie du greffon contre l'hôte, des maladies auto-immunes à médiation lymphocytaire T, telles que le diabète de type I, ou la sclérose en plaques, et de l'hypersensibilité de type IV, qui intervient dans les phénomènes allergiques ainsi que dans la pathogenèse de maladies inflammatoires chroniques suivant une infection par un agent pathogène (notamment lèpre, tuberculose, leishmaniose, listérose, etc.).

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs de préparation et d'utilisation d'anticorps conformes à l'invention.

**EXEMPLE 1 : CHOIX D'UN ANTICORPS PRODUISANT DES FRAGMENTS MONOVALENTS PROPRIETES DE FRAGMENTS MONOVALENTS Fab ISSUS DE CD28.3.**

Certaines des propriétés de plusieurs anticorps anti-CD28 (CD28.1, CD28.2, CD28.3, CD28.4, CD28.5 et CD28.6) sont décrites dans la publication de NUNES et al. [Int. Immunol., 5, 311, (1993)]. Ces différents anticorps, qui ne sont pas accessibles au public, ont été fournis par le laboratoire de Daniel OLIVE (INSERM). Les propriétés de liaison à l'antigène des fragments monovalents Fab de ces différents anticorps ont été comparées.

5 mg de fragments Fab de chacun de ces anticorps ont été préparés par digestion à la papaine (rapport molaire papaine/anticorps = 1/100) pendant 24 heures à 37°C, suivie d'inactivation de l'enzyme au iodoacétamide 0,03 M et de dialyse contre du PBS pour éliminer l'idoacétamide.

**1) Liaison des fragments Fab à des cellules T Jurkat CD28+ :**

100 000 cellules Jurkat CD28+ en 100 µl sont incubées en PBS-BSA 1%-NaN<sub>3</sub> 0,1% à 4°C pendant 30 minutes avec des concentrations croissantes d'anticorps anti-CD28 ou

10

de leurs fragments Fab. Après lavage, les cellules sont incubées de manière similaire avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la FITC, lavées, et analysées en cytofluorométrie.

5 Les résultats sont illustrés par la Figure 2 :

Légende de la Figure 2 :

Axe des abscisses : concentration en anticorps ou fragments Fab

Axe des ordonnées : Intensité moyenne de fluorescence (IMF)

-◇- : F1 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.1

10 -■- : F2 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.2

-△- : F3= Fragments Fab de l'anticorps CD28.3

-×- : F5 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.5

-○- : F6 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.6

15 ..●.. : W1 = anticorps entier CD28.1

..\_\_.. : W2 = anticorps entiers CD28.2

-●- : W3 = anticorps entiers CD28.3

-\_- : W5 = anticorps entiers CD28.5

-\*- : W6 = anticorps entiers CD28.6

-▲- : Mara-1 = contrôle négatif (IgG1 de souris).

20 Ces résultats montrent que parmi les fragments Fab, seuls ceux issus de CD28.3 sont capables de se lier de manière significative aux cellules Jurkat CD28+ à des concentrations inférieures à 10 µg/ml

2) Effet des fragments Fab sur l'adhésion des cellules T  
25 Jurkat CD28+ à des cellules L murines transfectées exprimant  
la molécule B7-1. :

30 4 x 10<sup>5</sup> cellules humaines T (Jurkatt, CD28- positives) marquées au <sup>51</sup>Cr sont incubées pendant 2 heures dans une plaque de microtitration dans laquelle 10<sup>5</sup> cellules adhérentes LTK<sup>-</sup> ou LB7<sup>+</sup> (fibroblastes murins transfectés avec B7.1 humain [PAGES et al., J. Biol. Chem., 271, 9403, (1996)] ont été ensemencées 24 heures auparavant. Ces incubations sont réalisées en présence des fragments Fab issus des anticorps CD28.1 à CD28.6, ou de l'anticorps CD28.3, dilués à différentes dilutions dans du tampon PBS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>. 35 Les cellules adhérentes après lavages sont quantifiées par

11

lecture de la radioactivité résiduelle au compteur beta (PACKARD TOPCOUNT).

Les résultats sont illustrés par la Figure 3 :

Légende de la Figure 3 :

- 5 Axe des abscisses : pourcentage de cellules adhérentes  
Axe des ordonnées : concentration en anticorps  
—◆— : F1 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.1  
—■— : F2 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.2  
—▲— : F3 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.3  
10 —×— : F5 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.5  
—\*— : F6 = Fragments Fab de l'anticorps CD28.6  
..●.. : Anticorps entier CD28.3  
○ : Pas d'anticorps.

Ces résultats montrent que les fragments Fab issus de CD28.3 sont les plus efficaces pour inhiber les interactions CD28/B7. Ils inhibent l'adhésion à 90% à une concentration de 3 µg/ml, et avec une efficacité comparable à celle de l'anticorps CD28.3 entier, alors qu'à cette concentration, les fragments Fab issus des autres anticorps n'inhibent pas l'adhésion à plus de 50%.

**3) Effet des fragments Fab sur la prolifération en réaction lymphocytaire mixte :**

10<sup>5</sup> cellules mononucléées du sang périphérique sont mélangées avec 10<sup>5</sup> cellules mononucléées allogéniques irradiées à 35 Gy, en présence de concentrations variables des anticorps CD28.1 à CD28.6 ou des fragments Fab issus de ces anticorps. La réponse proliférative dans ces cultures est évaluée après 3 jours, par incorporation de (<sup>3</sup>H) thymidine pendant une durée de 16 heures.

30 Les résultats sont illustrés par la Figure 4 :

Légende de la Figure 4 :

- Axe des abscisses : concentration en anticorps  
Axe des ordonnées : réponse proliférative (cpm)  
Niveau basal de prolifération = 6500 cpm.  
35 —◆— : 28.1 = anticorps CD28.1  
—■— : 28.2 = anticorps CD28.2  
—▲— : 28.3 = anticorps CD28.3

- x- : 28.5 = anticorps CD28.5
- ..\*.. : 28.6 = anticorps CD28.6
- : Fab.1 = fragments Fab de l'anticorps CD28.1
- ..+.. : Fab.2 = fragments Fab de l'anticorps CD28.2
- 5 -\_- : Fab.3 = fragments Fab de l'anticorps CD28.3
- +- : Fab.5 = fragment Fab de l'anticorps CD28.5
- ◇- : Fab.6 = fragment Fab de l'anticorps CD28.6.

Ces résultats montrent que les fragments Fab issus de CD28.3 ou de CD28.6 sont les plus efficaces pour 10 inhiber la prolifération des cellules mononucléées. Les anticorps entiers CD28.1 à CD28.6, testés en parallèle, n'ont aucun effet inhibiteur ou bien stimulent la prolifération de par leur action stimulatrice sur le CD28.

**Effet des fragments Fab issus de CD28.3 sur la prolifération induite par un super-antigène.**

Pour cette expérimentation des cellules T CD4+ répondeuses ont été mélangées avec des PBMC isogéniques irradiées, en présence de 50 ng/ml de toxine-1 du syndrome de choc toxique (TSST-1) qui stimule spécifiquement les cellules 20 T V $\beta$ 2+, soit en l'absence d'anticorps, soit en présence d'anti-B7-1 (1  $\mu$ g/ml), d'anti-B7-2 (0,5  $\mu$ g/ml), de CTLA4Ig (10  $\mu$ g/ml), ou de fragments Fab issus de CD28.3 (10  $\mu$ g/ml).

La réponse proliférative dans ces cultures est évaluée après 1, 3, 6, et 8 jours, par incorporation de ( $^3$ H) 25 thymidine pendant une durée de 16 heures.

Les résultats sont illustrés par la Figure 5 :

Légende de la Figure 5 :

Axe des abscisses : temps de culture

Axe des ordonnées : indice de prolifération = IP

$$30 \quad IP = \frac{cpm \text{ réaction mixte lymphocytaire} - cpm \text{ cellules stimulatrices irradiées seules}}{cpm \text{ cellules répondeuses non stimulées}}$$

- ◆- : Fab anti-CD28.3
- x- : anti B7-2
- 35 -■- : CTLA-4 Ig
- ..\*.. : anti-B7-1+2
- ▲- : anti-B7-1
- : pas d'anticorps

TSST-1 induit une prolifération importante des cellules T CD4+. En présence d'anti-B7, de CTLA4Ig, ou des fragments Fab de CD28.3, on observe une inhibition de cette prolifération de 70% après 6 jours.

5 **Effet des fragments Fab issus de CD28.3 sur la production de cytokines.**

Afin de déterminer si les fragments Fab issus de CD28.3 pouvaient induire une déviation immune *in vitro*, une réaction lymphocytaire mixte (PBMC issues d'un donneur A/10 PBMC irradiées issues d'un donneur B) a été effectuée, en présence de fragments Fab issus de CD28.3.  $10^5$  cellules mononucléées du sang périphérique d'un donneur sont mélangées avec  $10^5$  cellules mononucléées allogéniques irradiées à 35 Gy, et cultivées pendant 5 jours en présence ou en 15 l'absence de 10 µg/ml de Fab issus de l'anticorps CD28.3.

L'ARN des cellules répondeuses a été extrait, et la quantité d'ARNm de cytokines a été évaluée par mesure quantitative du nombre de transcrits, rapportée à la quantité d'HPRT, à l'aide d'un TaqMan (Perkin Helmer).

20 On observe en présence de fragments Fab issus de CD28.3., une réduction de la production d'IFNy et d'IL2, et une augmentation de la production d'IL10. Cette déviation de la réponse immune suggère une orientation vers une réponse de type Th2. Ce résultat est inattendu dans la mesure où il a 25 été rapporté que l'engagement de CTLA4 (qui est supposé intervenir lors du blocage de CD28 seul) conduit à une réponse de type Th1.

**Traitemennt in vitro de l'anticorps CD28.3 et des fragments Fab issus de celui-ci par les cellules T humaines.**

30 Une éventuelle internalisation des fragments Fab de l'anticorps CD28.3 dans les cellules T humaines a été recherchée, en comparaison avec l'anticorps entier CD28.3.

Des cellules T Jurkatt ont été incubées en milieu de culture avec 100 µg/ml d'anticorps CD28.3, à 37°C ou à 35 0°C. À différents temps, les cellules ont été lavées avec du tampon PBS froid contenant 0,1% de sérum-albumine bovine, et du NaN<sub>3</sub>, afin de bloquer la motilité membranaire. Les

anticorps liés ont été révélés avec un anticorps secondaire de chèvre anti-souris, marqué à la fluorescéine. Les cellules ont été montées dans du MOVIOL et analysées par microscopie confocale.

5               On observe ainsi que les anticorps CD28.3 entiers se liant aux cellules T Jurkatt sont capturés et disparaissent de la surface cellulaire à 37°C, mais pas à 0°C. Au contraire, les fragments Fab restent fixés en surface de la cellule. Ceci indique que la fixation des anticorps 10 divalents CD28.3 entraîne la dimérisation de CD28, ce qui conduit à leur entrée dans la cellule, alors que les fragments monovalents Fab, qui n'induisent pas cette dimérisation, demeurent en surface.

**EXAMPLE 2 : PROPRIETES D'UN FRAGMENT scFv DERIVE DE  
15 L'ANTICORPS CD28.3.**

La Figure 1 représente la séquence nucléotidique et la séquence polypeptidique déduite d'un fragment scFv dérivé de l'anticorps CD28.3. Les portions de cette séquence correspondant au fragment variable de la chaîne lourde et de 20 la chaîne légère sont représentés en lettres capitales. La séquence correspondant au fragment variable de la chaîne légère est en outre souligné. La séquence du lieur est représentée en lettres minuscules. Les séquences des CDRs de la chaîne lourde et de la chaîne légère sont encadrées.

25               La séquence nucléotidique codant ce fragment scFv est également représentée dans la liste de séquences en annexe, sous le numéro SEQ ID NO:°1.

L'ADNc codant ce fragment scFv a été inséré dans le vecteur pIG6 (Biochemisches Institut, Universität Zurich). 30 Ce vecteur comprend notamment un marqueur de résistance à l'ampicilline, et une cassette d'expression qui comprend un promoteur lac inducible, sous contrôle duquel sont placés : une séquence codant un peptide signal ompA, une séquence codant un peptide marqueur de séquence (code 1 lettre) DYKD, 35 une séquence codant un peptide marqueur c-myc, et une séquence codant un marqueur polyhistidine-5.

L'ADNC codant le fragment scFv décrit ci-dessus a été introduit entre les sites EcoRI et EcoRV de pIG6, en aval de la séquence codant le peptide DYKD et en amont de la séquence codant le marqueur c-myc.

5 La construction obtenue est dénommée pIg6-28.3.

#### Production en cellules procaryotes

Le vecteur pIg6-28.3 a été utilisé pour transformer des cellules *E.coli* JM83. Les cellules sont cultivées à 25°C, jusqu'à une DO<sub>50</sub> de 0,5. Après induction 10 par l'IPTG, le fragment scFv est produit sous forme soluble dans le périplasme. Il apparaît après électrophorèse et transfert de Western, sous forme d'une bande à environ 30 kDa.

Il est purifié à partir des extraits 15 périplasmiques des bactéries, obtenus après choc osmotique en 50 mM Tris-Cl, et ultracentrifugation du matériel insoluble, par chromarographie sur matrice de NI-NTA et échange d'ions sur DEAE-sépharose.

La liaison des fragments scFv présents dans 20 l'éluat de la colonne de NiNTA à des cellules Jurkat CD28+ est comparable à celle obtenue avec des fragments Fab obtenus à partir de l'anticorps CD28.3 par digestion à la papaine.

#### Production en cellules eucaryotes

Le vecteur pSec-28.3 a été utilisé pour 25 transfecter des cellules Cos. Les cellules sont cultivées à 37°C pendant 3 jours. Le fragment scFv est produit sous forme soluble dans le surnageant. Ce surnageant inhibite la réaction mixte lymphocytaire : 10<sup>5</sup> cellules mononucléées du sang périphérique d'un donneur sain sont mélangées avec 10<sup>5</sup> 30 cellules mononucléées du sang périphérique d'un autre donneur sain allogénique. La réponse proliférative dans ces cultures est évaluée après 5 jours par incorporation de (<sup>3</sup>H)Thymidine pendant une durée de 16 heures. On observe une inhibition importante de l'incorporation dépendant de la dilution du 35 surnageant utilisée. Un surnageant contrôle ne présente pas d'activité inhibitrice de la prolifération.

**EXEMPLE 3 : OBTENTION D'UNE PROTEINE DE FUSION COMPRENANT UN FRAGMENT scFv DE CD28.3.**

La séquence nucléotidique codant le fragment scFv décrit à l'Exemple 2 a été liée à l'extrémité 5' d'une 5 portion de l'ADNC de l' $\alpha$ 1-antitrypsine humaine (numéro d'accès GENBANK K01396) correspondant aux acides aminés 53 à 425, par l'intermédiaire d'un peptide charnière, de séquence VAAPS. La séquence résultante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 3, et le 10 polypeptide correspondant sous le numéro SEQ ID NO: 4.

**EXEMPLE 4 : CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION COMPRENANT LA SEQUENCE CODANT POUR L' $\alpha$ -1 ANTITRYPSINE ET PERMETTANT L'INTRODUCTION D'UNE SEQUENCE CODANT UN FRAGMENT scFv**

**Vecteur d'expression procaryote :**

15 Le vecteur pIG6 a été utilisé (Biochemisches Institut, Universität Zurich). Ce vecteur comprend notamment un marqueur de résistance à la streptomicine, et une cassette d'expression qui comprend un promoteur lac inductible, sous contrôle duquel sont placés : une séquence codant un peptide signal ompA, une séquence codant un peptide marqueur de séquence (code 1 lettre) DYKD, une séquence 20 codant un peptide marqueur c-myc, et une séquence codant un marqueur polyhistidine-5.

L'ADNC codant un fragment d' $\alpha$ 1-antitrypsine humaine correspondant aux acides aminés 53 à 425, a été introduit entre les sites EcoRI et EcoRV de pIG6, en aval de la séquence codant le peptide DYKD et en amont de la séquence codant le marqueur c-myc.

25 La Figure 1 schématise la construction obtenue, dénommée pIg6-Haat.

**Vecteur d'expression eucaryote :**

Le vecteur pSECTagB (Invitrogen, De Schelp, Pays Bas) a été utilisé. Ce vecteur comprend notamment un marqueur de résistance à l'ampicilline, un marqueur de résistance à la zéocine, et une cassette d'expression qui comprend un promoteur CMV, sous contrôle duquel sont placés : une 35

séquence codant un peptide signal de la chaîne légère IgG Kappa, une séquence codant un peptide marqueur c-myc, et une séquence codant un marqueur polyhistidine-6.

L'ADNc codant un fragment d' $\alpha$ 1-antitrypsine humaine correspondant aux acides aminés 53 à 425, a été introduit entre les sites BamHI et EcoRI du vecteur PSEC B Tag, en amont de la séquence codant le marqueur c-myc.

La Figure 2 schématise la construction obtenue, dénommée pSecHaat.

**10 EXEMPLE 5 : CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION INTEGRANT LA SEQUENCE CODANT LA PROTEINE DE FUSION scFv CD28.3/ $\alpha$ 1-ANTITRYPINE**

**Vecteur d'expression procaryote :**

L'ADNc codant la protéine de fusion ScFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine décrite à l'exemple 3 ci-dessus a été introduit entre les sites EcoRI et XhoI de pIG6, en aval de la séquence codant le peptide DYKD et en amont de la séquence codant le marqueur c-myc.

La Figure 3 schématise la construction obtenue, dénommée pIg6-28.3Haat.

**Vecteur d'expression eucaryote :**

L'ADNc codant la protéine de fusion ScFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine décrite à l'exemple 3 ci-dessus a été introduit entre les sites BamHI et XhoI du vecteur PSEC B Tag, en amont de la séquence codant le marqueur c-myc.

La Figure 4 schématise la construction obtenue, dénommée pSec-28.3Haat.

Ce vecteur, hébergé dans *E.coli* DH5 $\alpha$ , a été déposé le 11 décembre 2001 auprès de la CNCM, sous le numéro I-2762.

**EXEMPLE 6 : EXPRESSION ET PURIFICATION DES PROTEINES DE FUSION**

**En cellules procaryotes :**

Le vecteur pIg6-28.3Haat a été utilisé pour transformer des cellules *E.coli* JM83. Les cellules sont cultivées à 25°C, jusqu'à une DO<sub>550</sub> de 0,5. Après induction

par l'IPTG, la protéine est produite sous forme soluble dans le périplasme. Elle apparaît après électrophorèse et transfert de Western, sous forme d'une bande à environ 74 kDa.

5 Elle peut être purifiée à partir des extraits périplasmiques en utilisant une matrice de chromatographie d'affinité NI-NTA, et/ou une matrice de chromatographie d'affinité anti-c-myc. Elle peut également être purifiée à partir d'une colonne d'affinité anti- $\alpha$ 1-antitrypsine.

10 **En cellules eucaryotes :**

Le vecteur pSec-28.3Haat a été utilisé pour transfecter des cellules CHO par lipofection. Les cellules sont cultivées en présence de 200  $\mu$ g/ml de zéocine en milieu MEM contenant 10% de sérum de veau foetal.

15 La protéine est sécrétée dans le milieu de culture.

Après séparation par électrophorèse, transfert de Western, et révélation par un anticorps anti-c-myc elle apparaît sous forme d'une bande à environ 80 kDa.

20 **EXAMPLE 7 : TESTS D'ACTIVITE D'UNE PROTEINE DE FUSION scFv / $\alpha$ 1-ANTITRYPSINE**

L'activité anti-CD28 de la protéine de fusion scFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine obtenue à l'exemple 6 ci-dessus est évaluée par sa liaison à la molécule CD28, ou à des 25 cellules exprimant CD28 sur leur membrane, et son absence de liaison à des cellules qui n'expriment pas CD28.

L'activité immunosuppressive de la protéine de fusion scFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine obtenue à l'exemple 6 ci-dessus est évaluée par l'inhibition de l'adhésion à B7, et 30 l'inhibition de l'activation induite du lymphocyte T.

Ces activités anti-CD28 et immunosuppressive ont été mesurées par les tests suivants :

**Activité anti CD28**

**Mesure au biosenseur des paramètres de liaison à CD28:**

35 Du CD28 humain recombinant a été immobilisé sur le détecteur du biosenseur (BIACORE). Une protéine de fusion

scFv CD28.3/α1-antitrypsine obtenue comme décrit à l'exemple 6 ci-dessus a été mise en contact avec le détecteur. Les paramètres de liaison sont : KA (1/M) 2.86<sup>e</sup>9 ; KD (M) : 3.49<sup>e</sup>-10. En comparaison, ces paramètres mesurés pour le fragment 5 Fab de l'anticorps CD28.3 sont : KA (1/M) : 9.69<sup>e</sup>8 ; KD (M) : 1.03<sup>e</sup>-9. L'affinité pour CD28 du fragment Fab de l'anticorps CD28.3 et de la protéine de fusion sont donc comparables.

Test de reconnaissance spécifique de CD28 en cytofluorométrie :

10             $10^5$  cellules Jurkat (CD28+) et U937 (CD28-) sont incubées en PBS-BSA 1%-NaN3 0,1% à 4°C pendant 1 heure avec des concentrations croissantes de la protéine de fusion scFv CD28.3/α1-antitrypsine. Après lavage, les cellules sont incubées avec un anticorps de lapin anti-alpha-1-15 antitrypsine, puis avec un anticorps de chèvre anti-lapin conjugué à la FITC, lavées, et analysées en cytofluorométrie. On observe une liaison dépendante de la dose sur les cellules Jurkat (CD28+) et pas de liaison sur les cellules U937 (CD28-). Ceci montre la spécificité de la protéine de fusion 20 pour la molécule CD28 et son absence de réactivité envers d'autres molécules exprimées par des cellules hématopoïétiques humaines.

Activité immunosuppressive

Test d'adhésion CD28/B7-dépendant :

25             $4 \times 10^5$  cellules humaines T (Jurkatt, CD28-positives) marquées au <sup>51</sup>Cr sont incubées pendant 2 heures dans une plaque de microtitration dans laquelle  $10^5$  cellules adhérentes LTK<sup>-</sup> ou LB7<sup>+</sup> (fibroblastes murins transfectés avec B7.1 humain [PAGES et al., J. Biol. Chem., 271, 9403 (1996)]) 30 ont été ensemencées 24 heures auparavant. Ces incubations sont réalisées en absence ou en présence de la protéine de fusion scFv CD28.3/α1-antitrypsine, diluée à différentes concentrations dans du tampon PBS sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>. Les cellules adhérentes après lavages sont quantifiées par 35 lecture de la radioactivité résiduelle au compteur beta (PACKARD TOPCOUNT). On observe une inhibition de l'adhésion en présence de la protéine de fusion scFv CD28.3/α1-

antitrypsine, inhibition directement dépendante de la dose de protéine de fusion utilisée.

Inhibition de l'activation :

5         $5 \times 10^4$  cellules T (polyclonales humaines, déplétées en cellules CD11b) sont stimulées avec  $1 \times 10^4$  cellules d'hybridome OKT3 (anti-CD3) irradiées, ou avec des cellules B CD28 $^+$  allogéniques (déplétées en cellules CD28 $^+$ ) en absence ou en présence de quantités variables de la protéine de fusion scFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine. La réponse 10 proliférative dans ces cultures est évaluée après 3 jours lorsque la stimulation est effectuée par des anti-CD3, ou après 7 jours lorsque la stimulation est effectuée par des cellules allogéniques, par incorporation de ( $^3$ H) Thymidine pendant une durée de 16 heures. On observe une inhibition 15 importante de l'incorporation en présence de la protéine de fusion scFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine, inhibition directement dépendante de la dose de protéine de fusion utilisée.

Inhibition de la réaction mixte lymphocytaire :

20       $10^5$  cellules mononucléées du sang périphérique d'un donneur sain sont mélangées avec  $10^5$  cellules mononucléées du sang périphérique de un autre donneur sain allogénique. La réponse proliférative dans ces cultures est évaluée après 5 jours par incorporation de ( $^3$ H) Thymidine pendant une durée de 16 heures. On observe une inhibition 25 importante de l'incorporation en présence de la protéine de fusion scFv CD28.3/ $\alpha$ 1-antitrypsine, inhibition directement dépendante de la dose de protéine de fusion utilisée.

## REVENDICATIONS

- 1) Protéine capable de se lier spécifiquement au récepteur lymphocytaire CD28 et de bloquer l'interaction CD28/B7, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins les 5 CDRs de la chaîne lourde et de la chaîne légère de l'immunoglobuline CD28.3, produite par l'hybridome CNCM I-2582.
- 2) Protéine selon la revendication 1, choisie parmi :
  - 10 a) l'anticorps CD28.3 produit par l'hybridome CNCM I-2582 ;
  - b) les fragments Fv, Fab, Fab'2 ou scFv de l'anticorps CD28.3 ;
  - c) les anticorps chimériques ou humanisés obtenus 15 à partir des régions variables de CD28.3 ;
  - d) les fragments Fv, Fab, Fab'2 ou scFv, d'un anticorps b) ;
  - e) les protéines recombinantes comprenant un fragment b) ou d) et un polypeptide hétérologue.
- 20 3) Molécule d'acide nucléique codant une protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 4) Vecteur d'expression, comprenant une molécule d'acide nucléique selon la revendication 3.
- 5) Vecteur d'expression selon la revendication 4, 25 caractérisé en ce qu'il s'agit du plasmide CNCM I-2762.
- 6) Cellule exprimant une protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2.
- 7) Cellule selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit de l'hybridome CNCM I-2582.
- 30 8) Cellule selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une cellule transformée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 3.
- 9) Procédé de préparation d'une protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce 35 qu'il comprend la mise en culture d'au moins une cellule selon une quelconque des revendications 6 à 8, et la récupération de ladite protéine à partir de ladite culture.

22

10) Utilisation d'une protéine selon une quelconque des revendications 1 ou 2, pour l'obtention d'un médicament.

11) Utilisation selon la revendication 10,  
5 caractérisée en ce que ladite protéine possède un seul site de liaison au récepteur CD28, et en ce que ledit médicament est un immunosuppresseur, bloquant sélectivement l'activation des cellules T par l'intermédiaire du récepteur CD-28.

12) Utilisation selon la revendication 11,  
10 caractérisée en ce que ledit médicament est destiné au traitement d'une pathologie choisie parmi le rejet de greffe, la maladie du greffon contre l'hôte, les maladies auto-immunes à médiation lymphocytaire T, les phénomènes allergiques, les maladies inflammatoires chroniques.

15

1/5

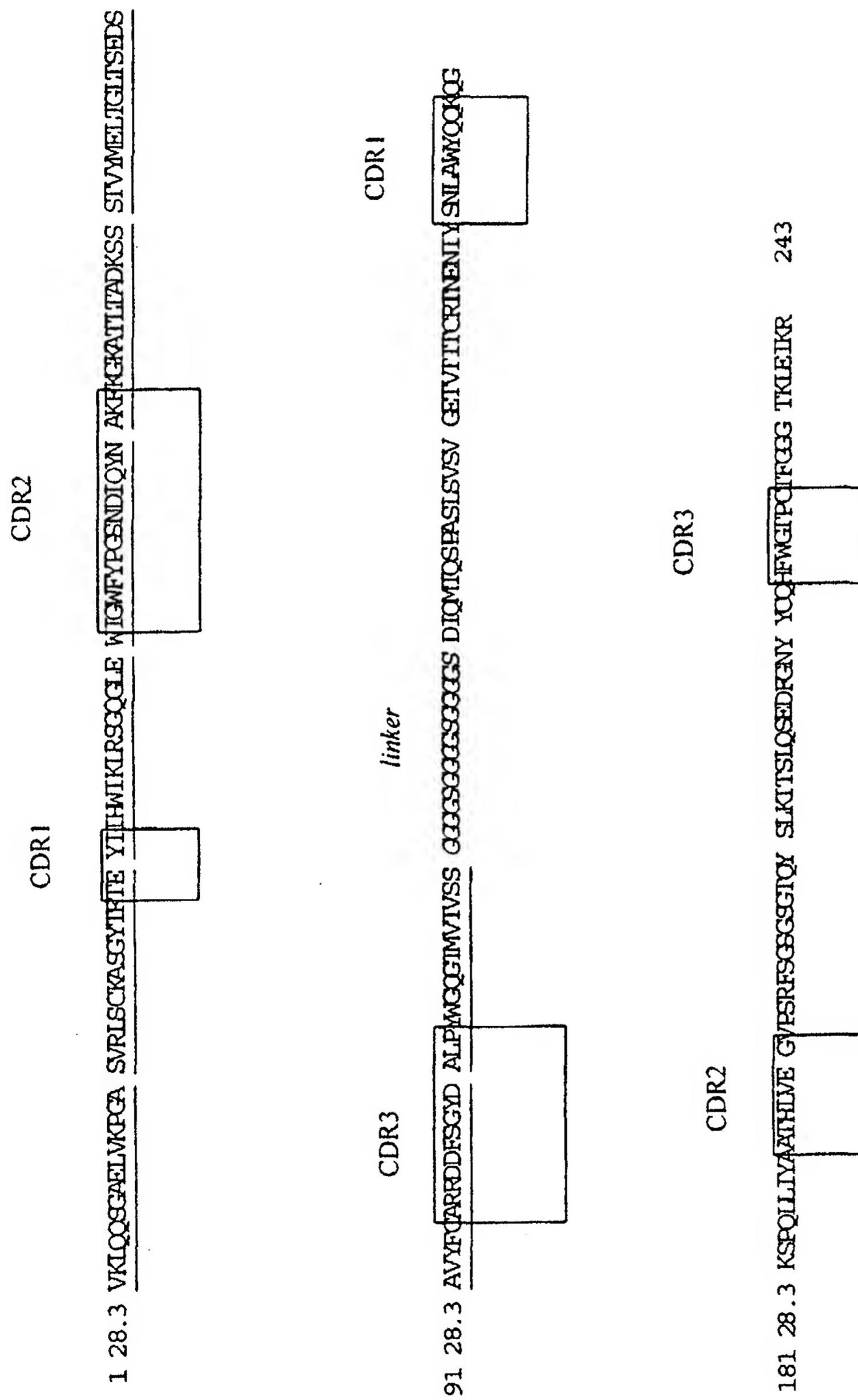


Figure 1

2/5

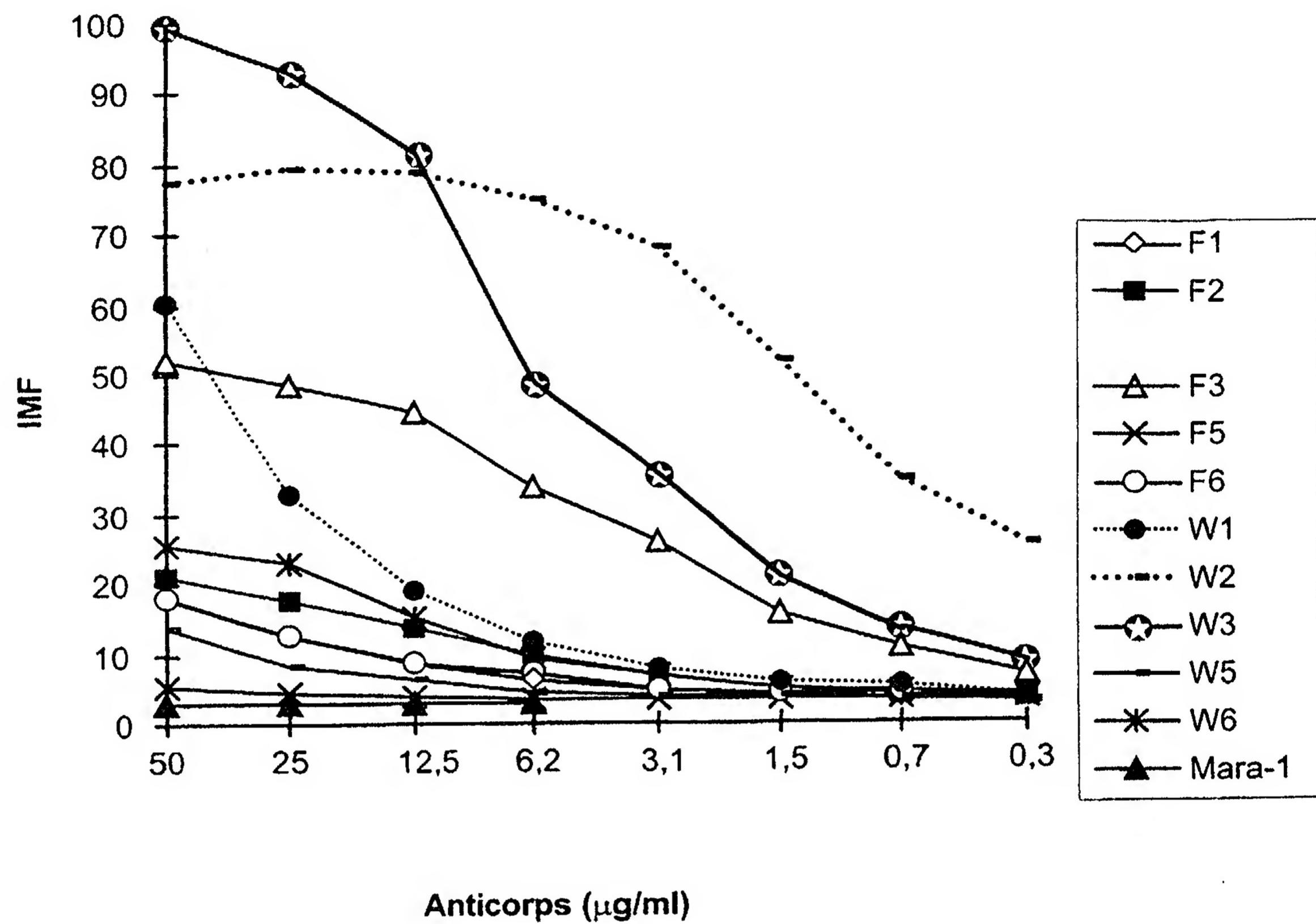


Figure 2

3/5

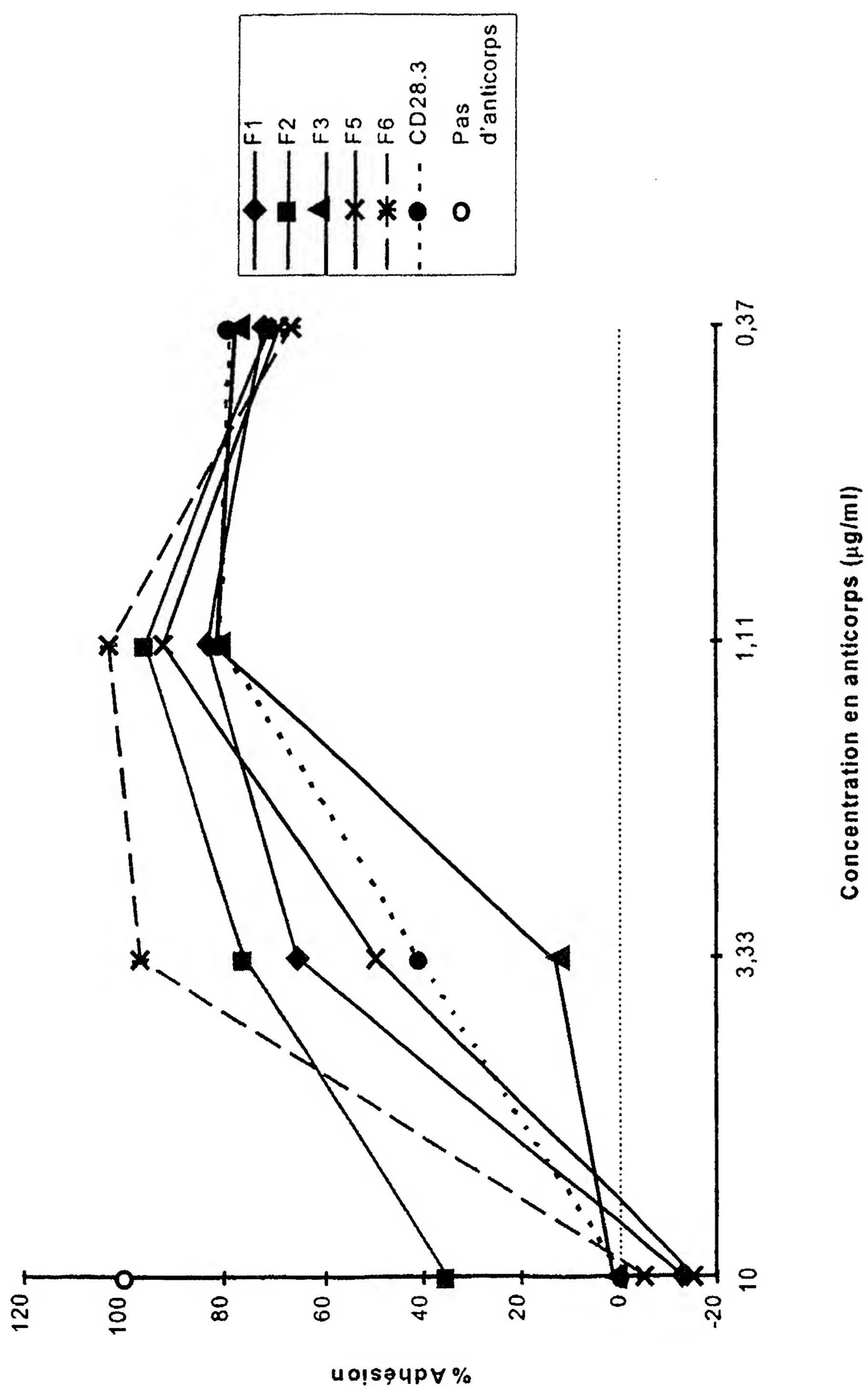


Figure 3

4/5

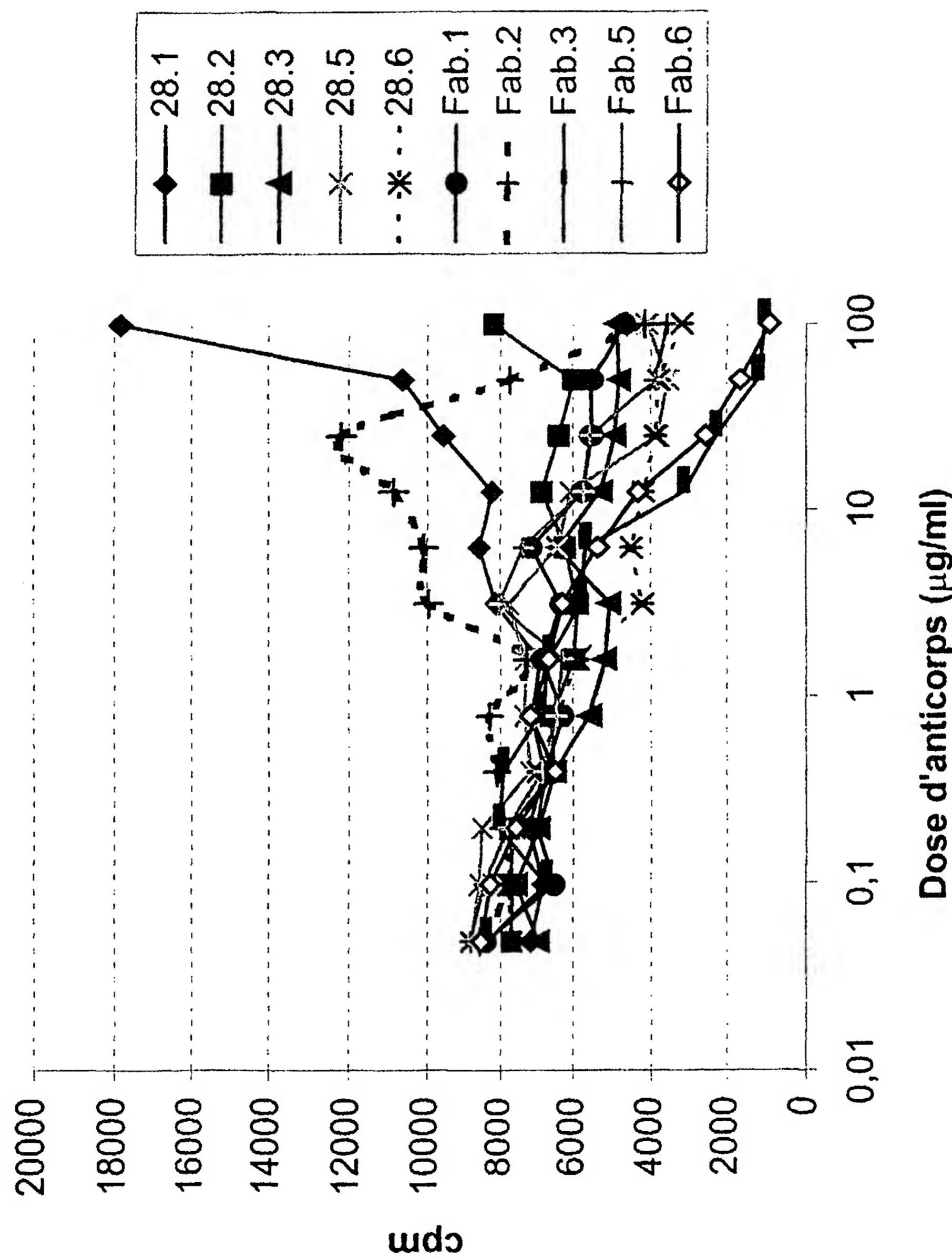
Dose d'anticorps ( $\mu\text{g/ml}$ )

Figure 4

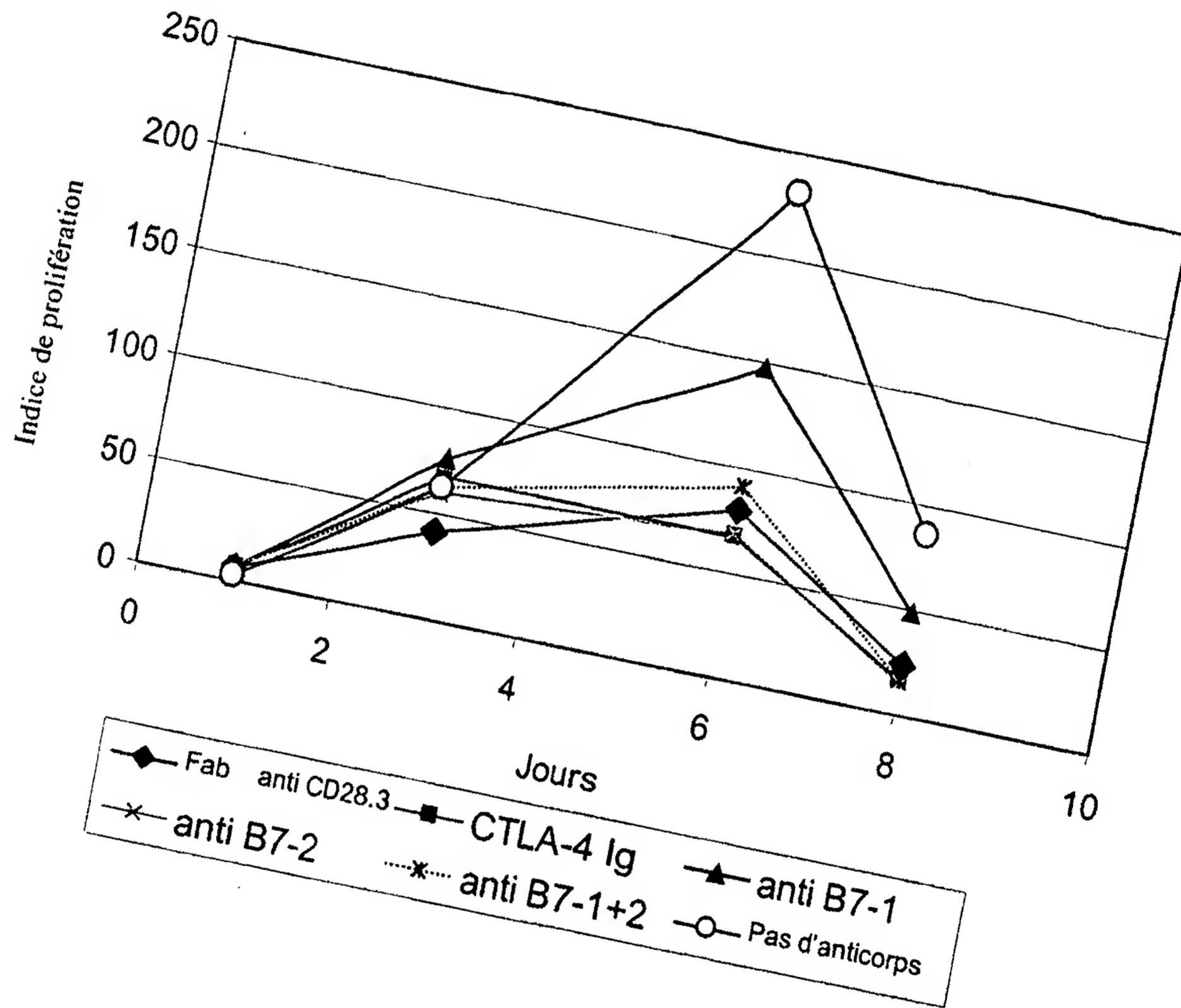


Figure 5

1

## LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM  
IMTIIXT SANGSTAT  
LAFLAMME, Geneviève  
VANHOVE, Bernard

<120> ANTICORPS ANTI-CD28

<130> MJPcb598-48

<140>

<141>

<150> 00 17025  
<151> 2000-12-26

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 732  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
scFv

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(732)

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(360)  
<223> chaîne légère

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (406)..(732)  
<223> chaîne lourde

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (361)..(405)  
<223> lieur

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (85)..(96)  
<223> CDR1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (139)..(189)  
<223> CDR2

<220>

<221> misc\_feature  
<222> (286)..(324)  
<223> CDR3

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (496)..(522)  
<223> CDR1

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (553)..(576)  
<223> CDR2

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (673)..(681)  
<223> CDR3

<400> 1  
gtc aag ctg cag cag tca gga gct gag ctg gtg aaa ccc ggg gcg tcg 48  
Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
1 5 10 15

gtg agg ctg tcc tgc aag gcg tct ggt tac acc ttc act gaa tat att 96  
Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile  
20 25 30

ata cac tgg ata aag ctg agg tct gga cag ggt ctt gag tgg att ggg 144  
Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
35 40 45

tgg ttt tac cct gga agt aat gat ata cag tac aat gcg aaa ttc aag 192  
Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys  
50 55 60

ggc aag gcc aca ttg act gcg gac aaa tcc tcc agc acc gtc tat atg 240  
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Val Tyr Met  
65 70 75 80

gaa ctt act gga ttg aca tct gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt gca 288  
Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
85 90 95

aga cgc gac gat ttc tct ggt tac gac gcc ctt cct tac tgg ggc caa 336  
Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln  
100 105 110

ggg acc atg gtc acc gtc tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt 384  
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
115 120 125

ggc tct ggc ggt ggc gga tcg gac atc cag atg acc cag tct cca gcc 432  
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala  
130 135 140

tcc cta tct gtt tct gtg gga gaa act gtc acc atc acg tgt cga aca 480  
Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr  
145 150 155 160

aat gaa aat att tac agt aat tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga 528  
 Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly  
 165 170 175

aaa tct cct cag ctc ctg atc tat gct gca aca cac tta gta gag ggt 576  
 Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly  
 180 185 190

gtg cca tca agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag tat tcc ctc 624  
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu  
 195 200 205

aag atc acc agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg aat tat tac tgt caa 672  
 Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln  
 210 215 220

cac ttt tgg ggt act ccg tgc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa 720  
 His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 225 230 235 240

ata aaa cgg act 732  
 Ile Lys Arg Thr

<210> 2

<211> 244

<212> PRT

<213> Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fragment  
 scFv

<400> 2

Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile  
 20 25 30

Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 35 40 45

Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys  
 50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met  
 65 70 75 80

Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala  
 85 90 95

Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala  
 130 135 140

Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr  
145 150 155 160

Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly  
165 170 175

Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly  
180 185 190

Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu  
195 200 205

Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln  
210 215 220

His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
225 230 235 240

Ile Lys Arg Thr

<210> 5

<211> 2013

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: fusion  
scFv anti-CD28/alpha-1 antitrypsine

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2013)

<220>

<221> misc\_signal

<222> (1)..(57)

<223> signal Omp A

<220>

<221> misc\_feature

<222> (64)..(75)

<223> Flag Tag

<220>

<221> misc\_feature

<222> (109)..(810)

<223> scFv 28.3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (826)..(1992)

<223> alpha-1 antitrypsine

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1993)..(2007)

<223> His Tag

<400> 3

atg aaa aag aca gct atc gcg att gca gtg gca ctg gct ggt ttc gct	48
Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala	
1 5 10 15	
acc gta gcg cag gcc gac tac aaa gat atc gtc aag ctg cag cag tca	96
Thr Val Ala Gln Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Val Lys Leu Gln Gln Ser	
20 25 30	
gga gct gag ctg gtg aaa ccc ggg gcg tcg gtg agg ctg tcc tgc aag	144
Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys	
35 40 45	
gcg tct ggt tac acc ttc act gaa tat att ata cac tgg ata aag ctg	192
Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu	
50 55 60	
agg tct gga cag ggt ctt gag tgg att ggg tgg ttt tac cct gga agt	240
Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser	
65 70 75 80	
aat gat ata cag tac aat gcg aaa ttc aag ggc aag gcc aca ttg act	288
Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr	
85 90 95	
gcg gac aaa tcc tcc agc acc gtc tat atg gaa ctt act gga ttg aca	336
Ala Asp Lys Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr	
100 105 110	
tct gag gac tct gcg gtc tat ttc tgt gca aga cgc gac gat ttc tct	384
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser	
115 120 125	
ggt tac gac gcc ctt cct tac tgg ggc caa ggg acc atg gtc acc gtc	432
Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	
130 135 140	
tcc tca ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc tct ggc ggt ggc gga	480
Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly	
145 150 155 160	
tcg gac atc cag atg acc cag tct cca gcc tcc cta tct gtt tct gtg	528
Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val	
165 170 175	
gga gaa act gtc acc atc acg tgt cga aca aat gaa aat att tac agt	576
Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser	
180 185 190	
aat tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct cag ctc ctg	624
Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu	
195 200 205	
atc tat gct gca aca cac tta gta gag ggt gtg cca tca agg ttc agt	672
Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser	
210 215 220	
ggc agt gga tca ggc aca cag tat tcc ctc aag atc acc agc ctg cag	720
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln	
225 230 235 240	

tct gaa gat ttt ggg aat tat tac tgt caa cac ttt tgg ggt act ccg Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro	245	250	255	768	
tgc acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg act gtg gct Cys Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala	260	265	270	816	
gca cca tct gaa ttc aac aag atc acc ccc aac ctg gct gag ttc gcc Ala Pro Ser Glu Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala	275	280	285	864	
ttc agc cta tac cgc cag ctg gca cac cag tcc aac agc acc aat atc Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile	290	295	300	912	
ttc ttc tcc cca gtg agc atc gct aca gcc ttt gca atg ctc tcc ctg Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu	305	310	315	960	
ggg acc aag gct gac act cac gat gaa atc ctg gag ggc ctg aat ttc Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe	325	330	335	1008	
aac ctc acg gag att ccg gag gct cag atc cat gaa ggc ttc cag gaa Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu	340	345	350	1056	
ctc ctc cgt acc ctc aac cag cca gac agc cag ctc cag ctg acc acc Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr	355	360	365	1104	
ggc aat ggc ctg ttc ctc agc gag ggc ctg aag cta gtg gat aag ttt Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe	370	375	380	1152	
ttg gag gat gtt aaa aag ttg tac cac tca gaa gcc ttc act gtc aac Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn	385	390	395	400	1200
ttc ggg gac acc gaa gag gcc aag aaa cag atc aac gat tac gtg gag Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu	405	410	415	1248	
aag ggt act caa ggg aaa att gtg gat ttg gtc aag gag ctt gac aga Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg	420	425	430	1296	
gac aca gtt ttt gct ctg gtg aat tac atc ttc ttt aaa ggc aaa tgg Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp	435	440	445	1344	
gag aga ccc ttt gaa gtc aag gac acc gag gaa gag gac ttc cac gtg Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Asp Phe His Val	450	455	460	1392	
gac cag gtg acc acc gtg aag gtg cct atg atg aag cgt tta ggc atg Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met	465	470	475	480	1440

ttt aac atc cag cac tgt aag aag ctg tcc agc tgg gtg ctg ctg atg Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met	485	490	495	1488	
aaa tac ctg ggc aat gcc acc gcc atc ttc ttc ctg cct gat gag ggg Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly	500	505	510	1536	
aaa cta cag cac ctg gaa aat gaa ctc acc cac gat atc atc acc aag Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys	515	520	525	1584	
ttc ctg gaa aat gaa gac aga agg tct gcc agc tta cat tta ccc aaa Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys	530	535	540	1632	
ctg tcc att act gga acc tat gat ctg aag agc gtc ctg ggt caa ctg Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu	545	550	555	560	1680
ggc atc act aag gtc ttc agc aat ggg gct gac ctc tcc ggg gtc aca Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr	565	570	575		1728
gag gag gca ccc ctg aag ctc tcc aag gcc gtg cat aag gct gtg ctg Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu	580	585	590		1776
acc atc gac gag aaa ggg act gaa gct gct ggg gcc atg ttt tta gag Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu	595	600	605		1824
gcc ata ccc atg tct atc ccc ccc gag gtc aag ttc aac aaa ccc ttt Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe	610	615	620		1872
gtc ttc tta atg att gaa caa aat acc aag tct ccc ctc ttc atg gga Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly	625	630	635	640	1920
aaa gtg gtg aat ccc acc caa aaa ctc gag gga gaa ttc gaa cag aaa Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys Leu Glu Gly Glu Phe Glu Gln Lys	645	650	655		1968
ctg atc tct gaa gaa gac ctg aac cac cac cac cac tga taa Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His His	660	665	670		2013

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 669

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle

<223> Description de la séquence artificielle: fusion  
scFv anti-CD28/alpha-1 antitrypsine

&lt;400&gt; 4

Met Lys Lys Thr Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala

1

5

10

15

Thr Val Ala Gln Ala Asp Tyr Lys Asp Ile Val Lys Leu Gln Gln Ser  
                   20                       25                       30  
 Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys  
                   35                       40                       45  
 Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu  
                   50                       55                       60  
 Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser  
                   65                       70                       75                       80  
 Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr  
                   85                       90                       95  
 Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr  
                   100                       105                       110  
 Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser  
                   115                       120                       125  
 Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val  
                   130                       135                       140  
 Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
                   145                       150                       155                       160  
 Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val  
                   165                       170                       175  
 Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser  
                   180                       185                       190  
 Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu  
                   195                       200                       205  
 Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser  
                   210                       215                       220  
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln  
                   225                       230                       235                       240  
 Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro  
                   245                       250                       255  
 Cys Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala  
                   260                       265                       270  
 Ala Pro Ser Glu Phe Asn Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala  
                   275                       280                       285  
 Phe Ser Leu Tyr Arg Gln Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile  
                   290                       295                       300  
 Phe Phe Ser Pro Val Ser Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu  
                   305                       310                       315                       320  
 Gly Thr Lys Ala Asp Thr His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe  
                   325                       330                       335  
 Asn Leu Thr Glu Ile Pro Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu  
                   340                       345                       350  
 Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr  
                   355                       360                       365  
 Gly Asn Gly Leu Phe Leu Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe  
                   370                       375                       380  
 Leu Glu Asp Val Lys Lys Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn  
                   385                       390                       395                       400  
 Phe Gly Asp Thr Glu Glu Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu  
                   405                       410                       415  
 Lys Gly Thr Gln Gly Lys Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg  
                   420                       425                       430  
 Asp Thr Val Phe Ala Leu Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp  
                   435                       440                       445  
 Glu Arg Pro Phe Glu Val Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val  
                   450                       455                       460  
 Asp Gln Val Thr Thr Val Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met  
                   465                       470                       475                       480  
 Phe Asn Ile Gln His Cys Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met  
                   485                       490                       495

Lys Tyr Leu Gly Asn Ala Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly  
500 505 510  
Lys Leu Gln His Leu Glu Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys  
515 520 525  
Phe Leu Glu Asn Glu Asp Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys  
530 535 540  
Leu Ser Ile Thr Gly Thr Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu  
545 550 555 560  
Gly Ile Thr Lys Val Phe Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr  
565 570 575  
Glu Glu Ala Pro Leu Lys Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu  
580 585 590  
Thr Ile Asp Glu Lys Gly Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu  
595 600 605  
Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe  
610 615 620  
Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly  
625 630 635 640  
Lys Val Val Asn Pro Thr Gln Lys Leu Glu Gly Glu Phe Glu Gln Lys  
645 650 655  
Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn His His His His His  
660 665

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	IPcb598/48	Demande internationale n	PCT/FR01/04203
---	------------	--------------------------	----------------

**INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE**

(règle 13bis du PCT)

**A.** Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description

page 3 \_\_\_\_\_, ligne 26-30 \_\_\_\_\_

**B. IDENTIFICATION DU DEPOT**D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire 

Nom de l'institution de dépôt

Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes

Adresse de l'institution de dépôt (*y compris le code postal et le pays*)Institut Pasteur  
28, rue du Docteur Roux  
75794 PARIS CEDEX 15  
FRANCE

Date du dépôt

28 NOVEMBRE 2000

n° d'ordre

I-2582

**C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES (le cas échéant )**Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements 

« En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant dans les conditions définies à la règle 28.4 CBE ».

**D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES**

(si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés)

EP : (AT, BE, CH&amp;LI, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)

**E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT (le cas échéant)**Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (*spécifier la nature générale des indications p. ex., "n" d'ordre du dépôt"*)

Réservé à l'office récepteur

Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale

Fonctionnaire autorisé

Réservé au Bureau international

Cette feuille est parvenue au Bureau international le :

19 FEB 2002

Fonctionnaire autorisé

Référence du dossier du déposant ou du mandataire	MJPcb598/48	Demande internationale n°	PCT/FR01/04203
---	-------------	---------------------------	----------------

**INDICATIONS RELATIVES A UN MICRO-ORGANISME DEPOSE**

(règle 13bis du PCT)

<b>A.</b> Les indications ont trait au micro-organisme visé dans la description page <u>6</u> , ligne <u>1-6</u> .	
<b>B. IDENTIFICATION DU DEPOT</b>	
D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt  Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt ( <i>y compris le code postal et le pays</i> )  Institut Pasteur 28, rue du Docteur Roux 75794 PARIS CEDEX 15 FRANCE	
Date du dépôt  <b>11 DECEMBRE 2001</b>	n° d'ordre  <b>I-2762</b>
<b>C. INDICATIONS SUPPLEMENTAIRES</b> ( <i>le cas échéant</i> )	
Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
« En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant dans les conditions définies à la règle 28.4 CBE ».	
<b>D. ETATS DESIGNES POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNEES</b> ( <i>si les indications ne sont pas données pour tous les Etats désignés</i> )	
EP : (AT, BE, CH&LI, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR)	
<b>E. INDICATIONS FOURNIES SEPAREMENT</b> ( <i>le cas échéant</i> )	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international ( <i>spécifier la nature générale des indications p. ex., "n" d'ordre du dépôt"</i> )	

Réserve à l'office récepteur  <input type="checkbox"/>	Réserve au Bureau international  <input type="checkbox"/>
Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale	Cette feuille est parvenue au Bureau international le :  <b>12 FEB 2002</b>
Fonctionnaire autorisé	Fonctionnaire autorisé

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**4 juillet 2002 (04.07.2002)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 02/051871 A3**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :**  
**C07K 16/28, C12N 15/13, 15/63, 5/20,**  
**A61K 39/395, A61P 37/06, 37/08, 29/00**

**VANHOVE, Bernard** [FR/FR]; 72 bis, rue Henri Barbusse, F-44400 REZE (FR).

**(21) Numéro de la demande internationale :**  
**PCT/FR01/04203**

**(74) Mandataires :** ORES, Béatrice etc.; CABINET ORES, 6, avenue de Messine, F-75008 PARIS (FR).

**(22) Date de dépôt international :**  
**26 décembre 2001 (26.12.2001)**

**(81) États désignés (national) :** JP, US.

**(25) Langue de dépôt :**  
**français**

**(84) États désignés (régional) :** brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

**(26) Langue de publication :**  
**français**

**Publiée :**  
— avec rapport de recherche internationale  
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues  
— avec une (des) indication(s) relative(s) à du matériel biologique déposé, fournie(s) selon la règle 13bis, séparément, et non avec la description

**(30) Données relatives à la priorité :**  
**00/17025 26 décembre 2000 (26.12.2000) FR**

**(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:**  
**15 août 2002**

**(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :** INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 PARIS (FR).

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

**(72) Inventeurs; et**  
**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :** SOULILLOU, Jean-Paul [FR/FR]; 32 ter, rue de l'Abbaye, F-44100 Nantes (FR). LAFLAMME, Geneviève [FR/FR]; 141, rue d'Allonville, Appt. 9, F-44000 NANTES (FR).



**WO 02/051871 A3**

**(54) Title:** ANTI-CD28 ANTIBODY

**(54) Titre :** ANTICORPS ANTI-CD28

**(57) Abstract:** The invention concerns an antibody directed against the CD28 receptor and capable of blocking CD28/B7 interaction, and proteins derived from said antibody, for use in particular to block CD28-dependent activation of lymphocytes.

**(57) Abrégé :** Anticorps dirigé contre le récepteur CD28, et capable de bloquer l'interaction CD28/B7, et protéines dérivées de cet anticorps, utilisables notamment pour bloquer l'activation CD28-dépendante des lymphocytes.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/04203

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K 15/28	C12N15/13	C12N15/63	C12N5/20	A61K39/395
A61P37/06	A61P37/08	A61P29/00		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAN P. ET AL.: "Humanization of an anti-CD28 antibody using germline human antibody sequences." BLOOD (2000 NOV) 96 (11 PART 1) 31A., XP002177441 abstract ---	1-12
X	NUNES J ET AL: "CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, (1993 MAR) 5 (3) 311-5., XP001024214 cited in the application the whole document ---	1-9 ---

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## ° Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

11 June 2002

Date of mailing of the International search report

21/06/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Flao, K

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/04203

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94 28912 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 22 December 1994 (1994-12-22) claims 1-33 ---	1-12
X	GILLILAND L. K. ET AL.: "Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments." TISSUE ANTIGENS, (1996) 47 (1) 1-20., XP000574883 page 11; table 4 ---	1-8
A	EP 0 440 373 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 7 August 1991 (1991-08-07) page 2, line 39 - line 50 page 3, line 43 - line 50 claims 1-69 ---	1-12
T	HASPOUT FABIENNE ET AL: "Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses." BLOOD. UNITED STATES 15 MAR 2002, vol. 99, no. 6, 15 March 2002 (2002-03-15), pages 2228-2234, XP002201786 ISSN: 0006-4971 the whole document ----	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/04203

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9428912	A	22-12-1994	AU WO	7107794 A 9428912 A1		03-01-1995 22-12-1994
EP 0440373	A	07-08-1991	AT CA DE DE DK EP ES GR HU IL ZA	152170 T 2034769 A1 69125735 D1 69125735 T2 440373 T3 0440373 A1 2101715 T3 3023723 T3 56723 A2 97023 A 9100463 A		15-05-1997 26-07-1991 28-05-1997 04-09-1997 30-06-1997 07-08-1991 16-07-1997 30-09-1997 28-10-1991 18-03-1997 30-09-1992

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

I de Internationale No  
PC1/FR 01/04203

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 7	C07K16/28	C12N15/13	C12N15/63	C12N5/20	A61K39/395
	A61P37/06	A61P37/08	A61P29/00		

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TAN P. ET AL.: "Humanization of an anti-CD28 antibody using germline human antibody sequences." BLOOD (2000 NOV) 96 (11 PART 1) 31A., XP002177441 abrégé ---	1-12
X	NUNES J ET AL: "CD28 mAbs with distinct binding properties differ in their ability to induce T cell activation: analysis of early and late activation events." INTERNATIONAL IMMUNOLOGY, (1993 MAR) 5 (3) 311-5., XP001024214 cité dans la demande le document en entier ---	1-9

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

### ° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 juin 2002

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

21/06/2002

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Le Fiao, K

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale N°

10./FR 01/04203

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 94 28912 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 22 décembre 1994 (1994-12-22) revendications 1-33 ---	1-12
X	GILLILAND L. K. ET AL.: "Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments." TISSUE ANTIGENS, (1996) 47 (1) 1-20., XP000574883 page 11; tableau 4 ---	1-8
A	EP 0 440 373 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 7 août 1991 (1991-08-07) page 2, ligne 39 - ligne 50 page 3, ligne 43 - ligne 50 revendications 1-69 ---	1-12
T	HASPOUT FABIENNE ET AL: "Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses." BLOOD. UNITED STATES 15 MAR 2002, vol. 99, no. 6, 15 mars 2002 (2002-03-15), pages 2228-2234, XP002201786 ISSN: 0006-4971 Le document en entier ---	1-12

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Code International No

.../FR 01/04203

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9428912	A 22-12-1994	AU 7107794 A WO 9428912 A1	03-01-1995 22-12-1994
EP 0440373	A 07-08-1991	AT 152170 T CA 2034769 A1 DE 69125735 D1 DE 69125735 T2 DK 440373 T3 EP 0440373 A1 ES 2101715 T3 GR 3023723 T3 HU 56723 A2 IL 97023 A ZA 9100463 A	15-05-1997 26-07-1991 28-05-1997 04-09-1997 30-06-1997 07-08-1991 16-07-1997 30-09-1997 28-10-1991 18-03-1997 30-09-1992